

T R A N S L A T I O N

Japan Patent Agency, Gazette for Unexamined Patents (JP,A)

Patent Application Disclosure: Kokai H9-327291 (1997)

Disclosure Date: December 22, 1997

Inventions: 1 (Total of 6 pages)

Request for Examination: Requested 11

Int. Cl.6      Identification Symbol      Intra-agency No.

C12N 15/09 9282-4B

C07H 1/08

21/02

C12Q 1/88

7823-4B

## METHOD FOR EXTRACTING AND REFINING RNA

Application No.: H8-149128 (1996)

Application Date: June 11, 1996

Inventors: ISHIDA, Yoshikazu; IKEDA, Katsutoku; UEMURA, Hideki;

KAWAKAMI, Fumikio and KAWAMURA, Yoshihisa

Applicant: Toyo Boseki KK

Osaka-fu, Osaka-shi, Kita-ku, Doshimaham 2-2-8

[Title of Invention]

METHOD FOR EXTRACTING AND REFINING RNA

[Summary]

[Objective]

This invention offers a method for extracting and refining a highly pure RNA within a short period of time from an organism material, e.g., a cell, etc. without having a complicated operation.

[Means of Resolution]

A method for extracting and refining RNA that consists of the following processes (a) through (c) and which uses a DNA extraction refinement reagent kit.

(a) A dissolving solution containing a chaotropic substance, an extraction solution consisting of an organic solvent and a nucleic acid bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact with an organism material, e.g., a cell, etc. under acidic conditions, preferably under pH 3 - 6 conditions. The DNA contained in the organism material is absorbed in solid-phase.

(b) A solid-phase carrier which has absorbed RNA during the process (a) is washed with a washing solution.

(c) The RNA is then eluted from the solid-phase washed during the process (b) using eluent.

[Claims]

[Claim 1]

A method for extracting and refining RNA that consists of the following processes (a) through (c).

(a) A dissolving solution containing a chaotropic substance,

an extraction solution consisting of an organic solvent and a nucleic acid bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact with an organism material, e.g., a cell, etc. under acidic conditions, preferably under a pH 3 - 6 condition. The DNA contained in the organism material is absorbed in solid-phase.

(b) A solid-phase carrier which has absorbed RNA during the process (a) is washed with a washing solution.

(c) The RNA is then eluted from the solid-phase washed during the process (b) using eluent.

[Claim 2]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the acidic condition is pH 3 - 6.

[Claim 3]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the pH of the dissolving solution containing a chaotropic substance is 3 - 6.

[Claim 4]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the chaotropic substance is a guanidine thiocyanate.

[Claim 5]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the organic solvent is either a water-saturation phenol or a buffer solution saturation phenol, chloroform or a combination of these.

[Claim 6]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim

1 wherein the nucleic acid bondable solid-phase carrier is a carrier containing silica.

[Claim 7]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the nucleic acid bondable solid-phase carrier is a grain.

[Claim 8]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the nucleic acid bondable solid-phase carrier is a grain containing superparamagnetic metal oxide.

[Claim 9]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the extracting solution is either a water or TE buffer.

[Claim 10]

The method for extracting and refining RNA mentioned in Claim 1 wherein the nucleic acid bondable solid-phase carrier is a carrier containing a superparamagnetic metal oxide and also contains a process for separating the nucleic acid bondable solid-phase carrier and liquid phase by magnetic power.

[Claim 11]

An RNA extraction and refinement reagent kit which consists of a dissolving solution containing a chaotropic substance, a buffer solution with pH 3 - 6, an extracting solution consisting of an organic solvent, a nucleic acid bondable solid-phase carrier, a washing solution and an eluent.

[Detailed Explanation of Invention]

[0001]

#### [Field of Industrial Application]

This invention concerns a method for simply extracting a highly pure RNA from an organism material, e.g., cell, etc. by using a nucleic acid bondable solid-phase carrier and a reagent kit for extracting and refining RNA for use in this method. This reagent kit is also applicable to an automatic nucleic acid extracting device.

[0002]

#### [Prior Art Technology]

The extraction refinement of nucleic acid from an organism material, e.g., a cell containing nucleic acid, is an important step in the fields of gene technology and clinical diagnosis. For example, in a case of analyzing a certain gene, nucleic acid (e.g., DNA and RNA) must be extracted from the organism material (e.g., a cell which holds the gene). In the case of DNA/RNA diagnosis for the detection of a contagious body (e.g., blood, etc.) DNA or RNA nucleic acid, which is commonly contained in an organism material, does not exist under liberated conditions. It exists in the shell, i.e., the membrane and wall of the cell which is comprised of protein, lipid and sugar. In most cases, a nucleic acid itself is formed of a complex of protein. Therefore, when extracting and refining nucleic acid from an organism material, a nucleic acid is liberated by conducting a physical crushing treatment by either supersonic wave or heat, an enzyme treatment by protease, and a treatment using a surfactant and modifier, etc. Nucleic acid must be refined from the crushed substance by an extraction operation or

by ultracentrifugal separation using an organic solvent (e.g., phenol, etc.) and column chromatography, etc. using a carrier (e.g., an ion exchanging body, etc.). These methods have been optimumly used for a nucleic acid and starting material and also by combining them according to the use of the extracted nucleic acid.

[0003]

Commonly, the AGPC method [Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987)] has been often used as a method for extracting and refining RNA from an organism material, (e.g., a cell, etc.). This method uses the following processes (1) through (4).

(1) A guanidium thiocyanate and a solution containing a phenol and chloroform are successively added to an organism material, (e.g., a cell, etc.) and the membrane or wall of the cell is crushed. A protein which has bonded with nucleic acid is then modified and a genome DNA is distributed to an organic phase.

(2) Only a water phase which contains RNA is separated by a centrifugal separation.

(3) The RNA is made into an insoluble condition in this water phase by adding either ethanol or isopropanol. (Either an ethanol precipitation means or an isopropanol precipitation means).

(4) Only the RNA is separated by a centrifugal separation. This AGPC method has the merit of obtaining RNA simply and within a short period of time when compared with an RNA extraction and refinement method which uses other means of ultracentrifugal separation. However, this method requires complicated operations (e.g., a centrifugal separation or a water-phase separation); the

ethanol precipitation means or isopropanol precipitation means which require a lengthy operation. Therefore, a method that can extract and refine RNA more easily and within a short period of time is needed, especially when a quick analyzation of many samples during a critical diagnosis, etc., is required.

[0004]

There is a method for using a silica as a nucleic acid bondable solid-phase carrier [Japanese Kokai Patent Publication No. H2-289596]. It is a simple and convenient nucleic acid extraction method. This method is capable of extracting a nucleic acid from an organism material, (e.g., a cell, etc.) in one step. Because a low-density buffer solution (e.g., water or a TE buffer, etc.) is used as the eluent, the extracted nucleic acid can be directly able used for a post analysis without conducting desalination and condensation, ( e.g., a means of ethanol precipitation, etc.). However, when trying to extract RNA from a cell by this method, a large amount of genome DNA in addition to RNA mixes into the recovered solution because a genome DNA is absorbed into a silica carrier, the same as RNA. Therefore, in order to obtain only RNA, a further refinement operation, (e.g., an enzyme treatment, ultracentrifugal separation or column chromatography, etc.) is unavoidably required.

[0005]

[Problems Resolved by this Invention]

The objective of this invention is to resolve these prior art technological problems. This invention offers a method for

extracting and refining a highly pure RNA within a short period of time from an organism material, e. g., a cell, etc. without requiring a complicated operation

[0006]

The inventors have discovered how to obtain RNA from an organism material with simple extraction and refinement by using a dissolving solution having a suitable pH, an organic solvent and a nucleic acid bondable solid-phase carrier. This invention is the result.

[0007]

More specifically, this invention is a method for extracting and refining RNA that consists of the following processes (a) through (c).

(a) A dissolving solution containing a chaotropic substance, an extraction solution consisting of organic solvent and a nucleic acid bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact with an organism material, e.g., a cell, etc., under acidic conditions, preferably under pH 3 - 6 conditions. The DNA contained in the organism material is absorbed in solid-phase.

(b) A solid-phase carrier which has absorbed RNA during the process (a) is washed with a washing solution.

(c) The RNA is then eluted from the solid-phase washed during the process (b) using eluent.

[0008]

This invention's method uses a grain containing a superparamagnetic metal oxide as the nucleic acid bondable solid-

phase carrier; it also consists of a process for separating a nucleic acid bondable solid-phase carrier and a liquid phase by magnetic power.

[0009]

This invention is also an RNA extraction and refinement reagent kit which consist of a dissolving solution containing a chaotropic substance, a pH 3 - 6 buffer solution, an extraction solution containing an organic solvent, a nucleic acid bondable solid-phase carrier, a washing solution and an eluent.

[0010]

[Enforcement Mode of Invention]

This invention's method for extracting and refining RNA is largely conducted by dividing it into the following three stages (a) a dissolving/absorbing process; (b) a washing process; and (c) an eluting process.

[0011]

In the dissolving/absorbing process (a), a cell dissolving solution, an organic solvent, nucleic acid bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact with an organism material, e.g., a cell, etc., and the organism material is dissolved. The RNA contained in this organism material is then absorbed by a nucleic acid bondable solid-phase. The dissolving solution, organic solvent and nucleic acid bondable solid-phase carrier are either separately or simultaneously added to an organism material, e.g., a cell, etc. In this invention, a dissolving solution containing a chaotropic substance, an extracting solution

consisting of organic solvent and nucleic acid bondable solid-phase carrier are added, mixed or make contact under an acidic conditions, preferably pH 3 - 6, or more preferably around the pH4 range.

[0012]

A tissue or culture cell, a bacteria culture, a blood component, (e.g., whole blood or serum), and a body fluid, (e.g., saliva, urine, semen, etc.) are used as the organism material in this invention.

[0013]

A dissolving solution containing the chaotropic substance used in this invention preferably contains a buffer agent. This buffer agent can be either contained in the dissolving solution beforehand or added after a cell has dissolved. There is also no particular restriction as to this buffer agent as long as it has buffering ability in the pH 3 - 6 range. A sodium acetate-acetic acid, sodium acetate-hydrochloric acid, etc. are used as this buffer agent. Its use density is preferably in the ranges of 1 - 500mM and pH 3 - 6.

[0014]

The dissolving solution used in this invention contains a chaotropic substance. There is no particular restriction as to the chaotropic substance as long as it is one which has an increasing action of water solubility on hydrophobic molecules and is able to contribute to the bonding to the solid-phase of RNA. More specifically, a guanidium thiocyanate, guanidium hydrochloric acid,

sodium iodide, potassium iodide, sodium perchloric acid, etc. are used. A guanidine thiocyanate is especially preferable because of its great ability to obstruct ribonuclease, which decomposes RNA. The density of these chaotropic substances used differs depending on the type of chaotropic substance. However, when a guanidine thiocyanate is used, it is preferably used in the range of 3 - 5.5M.

[0015]

A surfactant can be contained in the cell dissolving solution in order to crush the cell membrane or to modify a protein which is contained in the cell. There is no particular restriction as to the surfactant as long as the one used is for the extraction of nucleic acid from the cell, etc. More specifically, a nonionic surfactant, (e.g., polyoxy ethylene octyl phenyl ether, polyoxy ethylene solbitane monolaurate, polyoxy ethylene solbitane monolaurate, etc.); a catopmoc surfactant. (e.g., dodecyl trimethyl ammonium bromide, dodecyl trimethyl ammonium chloride, cetyl trimethyl ammonium bromide, etc.); a nonionic surfactant, (e.g., dodecyl sodium sulfate, N-lauryl sodium sarcosine, sodium chloric acid, etc.); and an ampho surfactant, (e.g., phosphor thidil ethanol amine, etc.) are used. An N-lauryl sodium sarcosine is especially preferable for use. The density of these surfactants differs depending on the surfactant used, but when N-lauryl sodium sarcosine is used, the preferable range is 0.1 - 2%.

[0016]

There is no particular restriction as to the organic solvent

used in this invention as long as it is one which does not obstruct the bonding of the solid-phase of RNA, but does obstruct the bonding of the solid-phase of DNA. This specification is not clear. However, it is felt that the organic solvent optimumly decreases the polarity of the liquid phase by adding it to a liquid phase. Therefore, it contributes to the selectivity of the bonding of the solid-phase of RNA and DNA which have different molecular surface polarity. A concrete example of the organic solvent used in this invention is a water-saturation phenol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 30methyl-1-propanol, acetone, etc.tc. A water-saturation phenol alone, or the properly proportioned mixture of water-saturation phenol and chloroform is especially preferred.

[0017]

There is no particular restriction as to the nucleic acid bondable solid-phase carrier used in this invention as long as the solid-phase absorbs nucleic acid under the presence of a chaotropic ion. More specifically, one which has a hydrophilic surface able to hold by reversible bonding, e.g., a dioxide silicate. Even more specifically, silica is preferably used. The other substance is also composed of silica, (e.g., glass, diatomaceous earth, one which has its surface treated by chemical modification or a complex of other substances such as superparamagnetic metal oxide, etc.). It may be used as long as it is one which does not obstruct the reversible bonding of the nucleic acid. There is also no particular restriction as to the form of the nucleic acid bondable solid-phase carrier, (e.g., grain, filter and reaction container,

etc.). However, when considering the effectiveness of absorption and elution, the grain form is preferable. A grain diameter of 0.05 - 500 $\mu$ m is preferably used.

[0018]

The washing process (b) is a process to separate as much as possible of only the nucleic acid bondable solid-phase carrier, which has absorbed RNA from the mixture of the cell crushing substance, the cell dissolving solution, the organic solvent and the nucleic bondable solid-phase carrier. At this point, washing is preferably repeated about one to three times using the washing solution.

[0019]

A concrete means for separating the nucleic acid solid-phase carrier in this invention differs depending on the form of the solid-phase used. For example, when using the grain form of nucleic acid bondable solid-phase, a centrifugal separation, filtration, and a column operation, etc. are preferred. When using one which contains superparamagnetic metal oxide in the grain as the solid-phase carrier, a simple means of magnetic separation which uses a magnet, etc. is possible and more preferable.

[0020]

There is no particular restriction as to the washing solution used in this invention, so long as it is one which does not accelerate the elution of plasmid DNA from solid-phase, but which does obstruct the bonding of the solid-phase of genome DNA and protein.

More specifically, 3 - 5.5M guanidine thiocyanate solution and 40 - 100% ethanol are preferred. Best results can be achieved by using these washing solutions. More specifically, after it is washed with a guanidine thiocyanate solution, it is preferably washed with 40% - 100% ethanol. When the cell dissolving solution and organic solvent used during the dissolving/absorbing processes are used as the washing solution, the removal of genome DNA and protein is more effectively conducted. At this point, it is preferably washed continuously with 40% - 100% ethanol.

[0021]

The eluting process (c) is a process for eluting the RNA from the nucleic acid bondable solid-phase carrier which has absorbed RNA. Therefore, there is no particular restriction as to the eluent used in this invention, as long as it is one which accelerates the elution of the RNA from solid-phase. More specifically, a water or TE buffer [10mM tris-hydrochloric acid buffer solution, 1mM EDTA, pH8.0] is preferred. The recovered RNA at this point can be directly used for enzyme reaction which has used an inverting enzyme, etc. without conducting a desalination (e.g., a dialysis and ethanol precipitation, etc.) and a concentration operation.

[0022]

This invention's method for extracting and refining RNA is composed of simple processes. Therefore, it can be easily applicable to a nucleic acid extractor which has automated the separation operation of solid-phase and reagent dividing injection

operation.

[0023]

This invention's extraction/refinement reagent kit of RNA contains a dissolving solution having a pH 3 - 6 and containing a chaotropic substance, an extracting solution consisting of organic solvent, a nucleic acid bondable solid-phase carrier, a washing solution and an eluent.

[0024]

[Examples]

This invention is explained more specifically with reference to the accompanying following examples. However, it is not restricted only to these following examples.

Example 1:

#### THE EXTRACTION/REFINEMENT OF RNA FROM HeLa CELL

##### (1) The Preparation of HeLa Cell

HeLa cell is cultivated in 15ml of (Dolbekko) eagle culture ground (Nissui KK) containing 10% calf serum (Gibco BRL KK) for 4 days at 37°C. After the cultivation has finished, a cell which has been liberated by trypsin treatment is transferred to a 15 ml capacity centrifugal separation tube and centrifugally separated for 5 minutes at 1,000 rpm. The result is then suspended by 10 ml of PBS [137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, 4.3 mM disodium hydrogenphosphate, 1.4 mM dipotassium hydrogen phosphate (pH 7.4)]. The result is divided and injected into a 1.5 ml capacity microtube so as to become the number of the cell of the result as  $1 \times 10^6$  pieces and centrifugally separated for 5 minutes

at 3,000 rpm. A cell pellet as the extraction material is then obtained by removing the supernatant.

[0025]

(2) The Extraction/refinement of RNA

500 ul of a cell dissolving solution [4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium citric acid (ph7.0), 0.5% N-sodium lauryl sarcosine, 0.1 M 2-mercaptoethanol] are added to the cell prepared in (1) above and dissolved. 50 ul of 2M sodium acetate-acetic acid (pH4.0) and 500 ul of water-saturation phenol are continuously and successively added and mixed vigorously. 40ul of a 0.5g/ml magnetic silica particle suspension solution [grain diameter: 1 - 10 um; 30% triion tetraoxide; specific area 280 m<sup>2</sup>/g; surface hole diameter: 2 - 6nm (Suzuki Yushi KK)] are added to the result. A microtube is placed on a magnetic stand (MPC-M: Dinal KK) and magnetic silica particles are then collected and the supernatant is removed. The microtube is removed form the magnetic stand and 1 ml of washing solution [5.3M guanidium thiocyanate, 52 mM tris-hydrochloric acid (pH6.4)] is added and mixed sufficiently. It is then placed on the magnetic stand and the supernatant is removed. The particles are washed, continuously washed with 1 ml of 70% ethanol twice and 100% ethanol once. After the supernatant is removed, the microtube is placed on 55°C heat block and left for 20 minutes. The ethanol inside of the tube is evaporated and removed. The particles are then dried. 100 ul of sterilized water is added to the result, mixed for 10 minutes at room temperature and placed on the magnetic stand. Magnetic silica particles are

then gathered and the supernatant is recovered. The recovered solution was almost 80 ul.

[0026]

10 ul of the recovered solution is placed for agarose gel electrophoresis and colored with ethidium bromide and photographed. The result is shown in Figure 1 (line 1). As is clear from Figure 1 (line 1), there is almost no mixing-in of genome DNA in the RNA sample which has been extracted by this invention's method. Therefore, it can be seen that this invention's method is capable of extracting a highly pure RNA.

[0027]

### (3) The Detection of Human Transferring Receptor RNA by RT-PCR

RT-PCR is conducted on a human transferring receptor RNA, as the target, to the recovered solution obtained in (2) above, and the RNA in the recovered solution is then detected. RT-PCR is conducted by using a commercially available reagent kit RT-PCR high (Toyo Boseki KK) and a primer for human transferring receptor amplification (CL5407-1: Clontech KK). First, M-MLX an inversion copy enzyme and a reagent for inversion copy containing inversion copy primer are added to 10 ul of the recovered solution obtained in (2) above. It is kept at 42°C for 20 minutes. An inversion copying reaction is then conducted. Parallel with this, the same operation is conducted without adding the inversion copy enzyme. The result is used as the negative control of inversion copying reaction. A PCR reagent containing heat-resistive DNA polymerase is added to the reaction solution which has finished inversion

copy, and the final liquid amount is set as 100 ul, and 30 cycles of one minute at 95°C; one minute at 56°C; and one minute at 72°C are enforced and PCR is conducted. 10 ul of the reacted solution is placed to agarose gel electrophoresis, colored with ethidium bromide and photographed. The result is shown in Figure 2. In Figure 2, line 1 is a size marker consisting of the PstI digestion substance of randamfarge (phonetic translation) DNA. Line 2 is the migration pattern of RT-PCR amplification product of RNA which has been extracted and refined by Example 1's method. Line 3 shows the migration pattern of PCR amplification produced when the negative control of inversion copying reaction is used. As is clear from Figure 2, an amplification product is seen only in the reacted solution (line 2) which has conducted inversion copy reaction. It can be seen that RNA extraction is possible by this invention's method and it is able to be immediately used for analysis by RT-PCR.

[0028]

Example 2:

EXTRACTION AND  
REFINEMENT OF C-TYPE HEPATITIS VIRUS (HCV)

(1) Serum which contains  $1 \times 10^7$  copy/ml of HCV is diluted by negative serum and a diluting system of  $2 \times 10^5$  -  $2 \times 10^3$  copy/ml is made and used as the extraction material. 50 ul of each diluting system serum sample ( $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^2$  copy equivalent) is used and RNA extraction is then conducted by the same method as in Example 1.

[0029]

## (2) Detection of HCV/RNA by RT-PCR

RT-PCR is conducted on the recovered solution obtained in the (1) above by using a non-translation zone of HCV/RNA as the target; HCV and RNA in the recovered solution are detected. A commercially available reagent kit RT-PCR high (Toyo Boseki KK) is used as the RT-PCR. An M-MLV inversion copy enzyme and an inversion copy reagent containing inversion copy primer are added to 5 ul of the recovered solution obtained in (1) above. The final liquid amount is set as 20 ul. An inversion copy reaction is conducted on this by maintaining the temperature at 42 °C for 60 minutes. The PCR reagent containing heat-resistive DNA polymerase is then added to the inversion copied reaction solution. The final liquid amount is set as 25 ul and a PCR reagent is successively added 30 seconds at 94 °C; 30 seconds at 53 °C; one minute at 72 °C, by using DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus KK). The final liquid amount is then set as 30 ul, and two stages of PCR are conducted by 28 cycles enforcement of 30 seconds at 94 °C; 30 seconds at 50 °C; and one minute at 72 °C.

10 ul of the reaction solution is placed to agarose gel electrophoresis, colored with ethidium bromide and photographed. The result is shown in Figure 3. Line 1 shows a size marker consisting of the PstI digestive substance of randafarge (phonetic translation) DNA. Lines 2 - 7 show the migration pattern of RT-PCR amplification product of RNA which has been extracted and refined by the method indicated in Example 2. Lines 2 and 3, lines 4 and 5, lines 6 and 7 show the results of a serum sample containing HCV

of equivalent  $1 \times 10^4$  copy,  $1 \times 10^3$  copy,  $1 \times 10^2$  copy, respectively. As is clear from Figure 3, amplification products are seen in serum samples containing HCV of equivalent  $1 \times 10^4$  copy and  $1 \times 10^3$  copy. It can be seen that RNA extraction is possible by this invention's method and is able to be immediately used for analysis by RT-PCR.

[0030]

Comparative Example 1:

Since better extraction and refinement of RNA, when compared with the prior art method are seen, the extraction of RNA is tried by using the prior art method which uses chaotropic substance and silica particles. 900 ul cell dissolving solution [4.7 M guanidium thiocyanate; 46 mM trishydrochloric acid (pH6.4); 1.2% polyoxy ethylene octyl phenyl ether; 20 mM EDTA] are added and dissolved in the cell prepared in Example 1's item (1) and continuously 40 ul of 0.5 mg/ml magnetic silica suspension solution and mixed for 10 minutes at room temperature. A magnetic silica is then gathered by placing a microtube over a magnetic stand. The supernatant is removed. By using the same method as in Example (2), the particles are washed with 1 ml of washing solution [5.3M guanidium thiocyanate; 52 mM trishydrochloric acid (pH6.4)] twice; with 1 ml of 70% ethanol twice and with 100% ethanol once. After the supernatant is removed, a microtube is placed on 55°C heater block and left for 20 minutes. The ethanol in the tube is then vaporized and removed. The particles are dried. 100 ul of sterilized water is added to the result and mixed for 10 minutes at room

temperature. By placing it on the magnetic stand, magnetic silica particles are then gathered. The supernatant is recovered. The recovered solution amount was about 80 ul. 10 ul of the recovered solution are placed to agarose gen electrophoresis, colored with ethidium bromide and photographed. The result is shown in Figure 1 (line 2). As is clear from Figure 1 (2), a large amount of genome DNA is mixed in the sample which has been extracted by the prior art method shown in Comparative Example 1.

[0031]

[Effect of Invention]

With this invention, a suitable dissolving solution and nucleic acid bondable solid-phase are used under an acidic condition and RNA contained in an organism material is uniquely absorbed. The RNA is also simply and conveniently recovered, extracted and refined by using a proper eluent without requiring a complicated post-treatment.

[Simple Explanation of Drawings]

[Figure 1]

A photograph in place of a drawing indicates the agarose gel electrophoresis pattern of RNA which has been extracted from culture cell by this invention's method and by the prior art method.

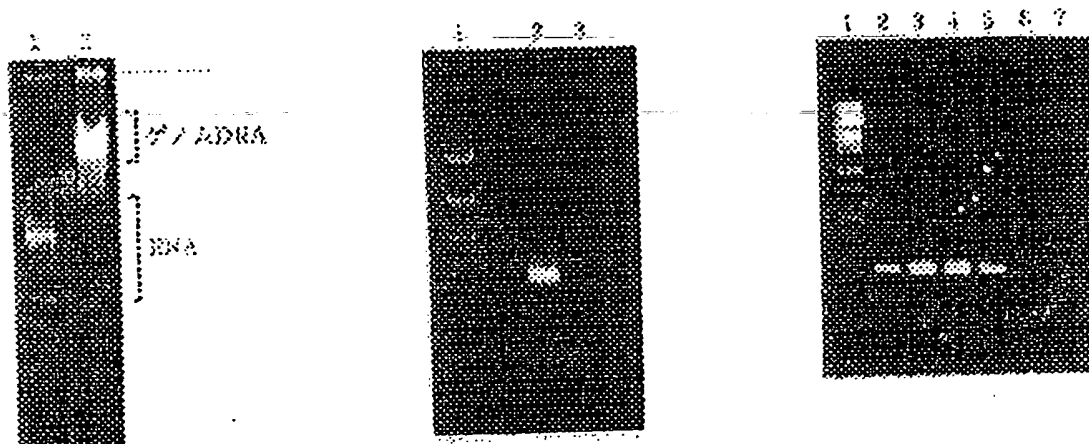
[Figure 2]

A photograph in place of a drawing indicates the agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR amplification product of RNA which has been extracted and refined from a culture cell by this

invention's method.

[Figure 3]

A photograph in place of a drawing indicates agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR amplification product which has extracted and refined from HCV positive serum by this invention's method.



Patent Applicant: Toyo Boseki KK

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-327291

(43) 公開日 平成9年(1997)12月22日

(51) Int. Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 H 1/08			C 0 7 H 1/08	
			21/02	
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-149128

(22) 出願日 平成8年(1996)6月11日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 石田 由和

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 池田 勝徳

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 上村 秀喜

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNAの抽出精製方法

(57) 【要約】

【課題】 細胞等の生物材料からRNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度でRNAを抽出し、精製する方法を提供する。

【解決手段】 下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするRNAの抽出精製方法および該方法に使用するRNAの抽出精製試薬キット。

(a) 細胞等の生物材料に、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件、好ましくはpH3～6にて添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料に含まれるRNAを固相上に吸着させ、(b) 上記(a)工程にてRNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、(c) 上記(b)工程にて洗浄した固相から、溶出液によりRNAを溶出させる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするRNAの抽出精製方法。

(a) 細胞等の生物材料に、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件下に添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料に含まれるRNAを固相上に吸着させ、

(b) 上記(a)工程にてRNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、

(c) 上記(b)工程にて洗浄した固相から、溶出液によりRNAを溶出させる。

【請求項2】 酸性条件がpH3～6である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項3】 カオトロピック物質を含む溶解液のpHが3～6である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項4】 カオトロピック物質がグアニジンチオシアン酸塩である請求項1に記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項5】 有機溶媒が水飽和フェノールまたは緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、またはこれらの組み合わせである請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項6】 核酸結合性固相担体がシリカを含む担体である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項7】 核酸結合性固相担体が粒子である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項8】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む粒子である請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項9】 抽出液が水あるいはTEバッファーである請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項10】 核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む担体であって、さらに、磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含むことを特徴とする請求項1記載のRNAの抽出精製方法。

【請求項11】 カオトロピック物質を含む溶解液、pH3～6の緩衝液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合性固相担体、洗浄液および溶出液を含むRNAの抽出精製試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は細胞等の生物材料から、核酸結合性固相担体を用いてRNAを簡便かつ純度よく抽出精製する方法ならびに該方法に用いるRNAを抽出精製するための試薬キットに関する。該試薬キットは自動核酸抽出装置にも応用しうる。

## 【0002】

【従来の技術】核酸を含有する細胞等の生物材料からの核酸の抽出精製は、遺伝子工学や臨床診断の分野では重要なステップである。例えば、ある遺伝子について解析

しようとする場合、まず、その遺伝子を保持する細胞等の生物材料からDNAやRNAといった核酸を抽出することが必要である。また、細菌やウイルスといった感染体の検出のためのDNA/RNA診断においても、血液等の生物材料から細菌やウイルスの核酸を抽出した後、検出することが必要である。一般に、生物材料に含まれるDNAやRNAといった核酸は、遊離した状態で存在するわけではなく、タンパク質、脂質、糖から構成される細胞膜や細胞壁等の殻の中に存在し、ほとんどの場合、核酸自身もタンパク質との複合体を形成している。したがって、生物材料から核酸を抽出精製する場合には、まず超音波や熱による物理的破砕処理やプロテアーゼによる酵素処理、界面活性剤や変性剤による処理等を施すことにより核酸を遊離させ、さらに、フェノール等の有機溶媒による抽出操作や超遠心分離、イオン交換体等の担体を使用したカラムクロマトグラフィー等により、破砕物中から核酸を精製する必要がある。これらの手法は、核酸や出発材料、さらには抽出した核酸の用途に応じて組み合わせられ、それぞれ最適化されて用いられている。

【0003】細胞等の生物材料からRNAを抽出精製する方法としては、いわゆるAGPC法[Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987)]が一般的によく用いられている。この方法は、(1)細胞等の生物材料にグアニジンチオシアン酸塩とフェノール、クロロホルムを含む溶液を順次、添加して細胞膜や細胞壁を破壊し、核酸に結合しているタンパク質を変性させ、さらにゲノムDNAを有機相へ分配させ、(2)遠心分離によりRNAが含まれる水相のみを分離し、(3)この水相にエタノール又はイソプロパノールを添加することによりRNAを不溶化させ(エタノール沈殿法又はイソプロパノール沈殿法)、(4)さらに遠心分離によってRNAのみを分離させることを利用した方法である。このAGPC法は、他の超遠心分離法を利用するRNA抽出精製法と比較して、短時間かつ簡便にRNAが得られるという長所がある。しかし、この方法には遠心分離や水相の分離という煩雑な操作や、エタノール沈殿法あるいはイソプロパノール沈殿法という長時間を要するステップが必要なため、特に臨床診断など多サンプルを迅速に解析する必要がある場合には、より簡便かつ短時間でRNAが抽出精製できる方法が要求される。

【0004】一方、簡便な核酸抽出法としてシリカを核酸結合性固相担体として使用する方法がある[特開平2-289596号公報]。この方法は、細胞などの生物材料から核酸を一段階で抽出することが可能なうえ、溶出液として水またはTEバッファーなど低濃度の緩衝液を使用するため、エタノール沈殿法などの脱塩、濃縮のための操作を経ることなく、抽出した核酸を直ちに後の解析に直接使用することができるという利点がある。しかし、この方法により細胞からRNAの抽出を試みた場合、ゲノムDNAもRNAと同様にシリカ担体へ吸着するため、

回収液中にはRNAのほかにも多量のゲノムDNAが混入する。そのため、RNAのみを得るためには、さらに酵素処理や超遠心分離、カラムクロマトグラフィー等の精製操作をおこなうことが必須である。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来から存在する技術の上記問題点を解決することであり、細胞等の生物材料からRNAを煩雑な操作を必要とすることなく、短時間かつ高純度でRNAを抽出し、精製する方法を提供することである。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、適当なpHを有する溶解液、有機溶媒、および核酸結合性固相担体により、生物材料からRNAを簡便に抽出精製し得ることを見出し、本発明に達した。

【0007】すなわち、本発明は、下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とするRNAの抽出精製方法である。

(a)細胞等の生物材料に、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件下に添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料に含まれるRNAを固相上に吸着させ、(b)上記(a)工程にてRNAを吸着させた固相担体を洗浄液により洗浄し、(c)上記(b)工程にて洗浄した固相から、溶出液によりRNAを溶出させる。

【0008】本発明では、核酸結合性固相担体が超常磁性金属酸化物を含む粒子であって、さらに磁力を利用して核酸結合性固相担体と液相を分離する工程を含むことがある。

【0009】また、本発明はカオトロピック物質を含む溶解液、pH3～6の緩衝液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合性固相担体、洗浄液および溶出液を含むRNAの抽出精製試薬キットである。

#### 【0010】

【発明の実施態様】本発明によるRNAの抽出精製方法は、(a)溶解・吸着工程、(b)洗浄工程、(c)溶出工程の3段階に大きく分けられる。

【0011】(a)溶解・吸着工程では、細胞等の生物材料に細胞溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体を酸性条件下に添加、混合あるいは接触させることにより、生物材料を溶解し、生物材料に含まれるRNAを核酸結合性固相へ吸着させる。上記溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体を細胞等の生物材料に、別々に添加しても、あるいは同時に添加しても良い。本発明においては、カオトロピック物質を含む溶解液、有機溶媒からなる抽出液、および核酸結合性固相担体を酸性条件下、好ましくはpH3～6、さらに好ましくはpH4付近にて添加、混合あるいは接触させることを特徴とする。

【0012】本発明において用いられる生物材料として

は、例えば組織や培養細胞、細菌培養物の他に、全血や血清、白血球等の血液成分、唾液、尿、精液等の体液が挙げられる。

【0013】本発明において使用するカオトロピック物質を含む溶解液には、緩衝剤を含有させることが好ましい。これは、予め溶解液に含まれていても、また、細胞を溶解した後に緩衝液として添加してもよい。この緩衝剤としては、一般に使用されるものであれば、特に限定されないが、pH3～6の範囲のいずれかのpHにおいて緩衝能を有するものがより好ましい。例えば、酢酸ナトリウム-酢酸、酢酸ナトリウム-塩酸等が挙げられ、その使用濃度としては1～500mM、pHは3～6の範囲が好適である。

【0014】本発明において用いられる溶解液には、カオトロピック物質が含まれる。このカオトロピック物質としては、一般にカオトロピック物質として知られているような、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しており、さらにRNAの固相への結合に寄与するものであれば特に限定されない。具体的には、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、よう化ナトリウム、よう化カリウム、過塩素酸ナトリウム等が挙げられる。これらのうち、RNAを分解するリボヌクレアーゼに対する阻害効果の大きいグアニジンチオシアン酸塩が好ましく用いられる。これらのカオトロピック物質の使用濃度は、用いられるカオトロピック物質により異なり、例えば、グアニジンチオシアン酸塩を使用する場合には、3～5.5Mの範囲となるように使用するのが好ましい。

【0015】また、カオトロピック物質を含む溶解液には、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で、界面活性剤を含有させてもよい。この界面活性剤としては、一般に細胞等からの核酸抽出に使用されるものであれば、特に限定されないが、具体的には、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート等の非イオン界面活性剤、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド等の陽イオン界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、コール酸ナトリウム等の陰イオン界面活性剤、ホスファチジルエタノールアミン等の両性界面活性剤が挙げられる。これらのうち、N-ラウロイルサルコシンナトリウムが好ましく用いられる。これらの界面活性剤の使用濃度は、用いられる界面活性剤により異なり、例えば、N-ラウロイルサルコシンナトリウムを使用する場合には、0.1～2%の範囲となるように使用するのが好ましい。

【0016】本発明において用いられる有機溶媒としては、RNAの固相への結合を妨げるものでなく、かつDNAの固相への結合を妨げるものであれば、特に限定さ

れない。この原理についての詳細は不明であるが、有機溶媒を液相に添加することにより液相の極性を適度に下げ、そのことによって、分子表面の極性が異なるRNAとDNAに固相との結合の選択性を付与しているものと考え。本発明において用いられる有機溶媒の具体例としては、水飽和フェノール、緩衝液飽和フェノール、クロロホルム、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、3-メチル-1-プロパノール、アセトン等が挙げられる。これらのうち、水飽和フェノールのみ、あるいは水飽和フェノールとクロロホルムを適当な割合で混合したものが好ましい。

【0017】本発明において用いられる核酸結合性固相担体としては、カオトロピックイオンの存在下で核酸を吸着、すなわち可逆的な結合により保持することができる親水性表面を有する担体であれば、特に限定されない。具体的には、二酸化ケイ素、すなわちシリカが好ましく用いられる。また、前記のような核酸との可逆的な結合を妨げるようなものでなければ、シリカから構成される他の物質、例えばガラス、ケイソウ土、あるいはこれらを化学的修飾により表面処理を施したものや、超常磁性金属酸化物等の他の物質との複合体も含まれる。また、この核酸結合性固相担体の形態としては、粒子、フィルター、反応容器等が具体的に挙げられるが特に限定されない。これらのうち、吸着と溶出の効率を考慮すると粒子の形態がより好ましく、このとき粒径は0.05～500μmがより好適である。

【0018】(b) 洗浄工程は、上記(a)における生物材料、溶解液、有機溶媒、核酸結合性固相担体の混合物から、RNAが吸着した核酸結合性固相担体のみを可能な限り分離する工程である。このとき、洗浄液を使用して約1～3回程度、繰り返し洗浄するのが好ましい。

【0019】本発明における液相と固相との具体的な分離手段としては、使用する核酸結合性固相担体の形態により異なり、核酸結合性固相担体が粒子の形態である場合には、遠心分離、ろ過、カラム操作等が好ましい。さらには、粒子内に超常磁性金属酸化物を含ませておいたものを固相担体として使用すれば、磁石等を用いた簡便な磁気分離法が可能となり、より好適である。

【0020】本発明において用いられる洗浄液としては、固相担体からのプラスミドDNAの溶離を促進するものでなく、かつ、ゲノムDNAやタンパク質の固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。具体的には、3～5.5Mグアニジンチオシアン酸溶液あるいは40～100%エタノールが好ましく、これらの洗浄液を併用するとより好適である。つまり、まず、グアニジンチオシアン酸溶液で洗浄した後、さらに40～100%エタノールで洗浄するのが好ましい。また、初めに溶解・吸着工程にて使用した細胞溶解液および有機溶媒を洗浄液として使用すると、ゲノムDNAとタンパク質の除去により有効である。このとき、続いて40～10

0%エタノールで洗浄するのが好ましい。

【0021】(c) 溶出工程は、上記(b)工程におけるRNAが吸着した核酸結合性固相担体から該RNAを溶離させる工程である。従って、本発明において用いられる溶出液としては、固相からのRNAの溶離を促進するものであれば、特に限定されない。具体的には、水あるいはTEバッファー[10mMトリス塩酸緩衝液、1mMEDTA, pH8.0]が好ましい。このとき回収したRNAは、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、逆転写酵素等を使用した酵素反応に直接使用することができる。

【0022】本発明によるRNAの抽出精製方法は、単純な工程から構成されるため、固相の分離操作や試薬分注操作を自動化した核酸抽出装置へ容易に応用しうる。

【0023】本発明のRNAの抽出精製試薬キットは、カオトロピック物質を含むpH3～6の溶解液、有機溶媒からなる抽出液、核酸結合性固相担体、洗浄液および溶出液を含む。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

**実施例1** HeLa細胞からのRNAの抽出精製

(1) HeLa細胞の調製

HeLa細胞を10%牛胎児血清(Gibco BRL社製)含有ダルベッコ変法イーグル培地(ニッスイ社製)培地15mlで37℃、4日間培養した。培養終了後、トリプシン処理により遊離した細胞を15ml容遠心分離管へ移し、1,000rpm、5分間遠心分離し、上清を除去した後、10mlのPBS[137mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、4.3mMリン酸水素二ナトリウム、1.4mMリン酸二水素カリウム(pH7.4)]にて懸濁した。これについて細胞数を計測したところ $7 \times 10^7$ 個であった。これをチューブ当たりの細胞数が $1 \times 10^6$ 個となるように1.5ml容マイクロチューブに分注し、3,000rpm、5分間遠心分離し、上清を除去することにより得られた細胞ペレットを抽出材料とした。

【0025】(2) RNAの抽出精製

上記(1)にて調製した細胞に500μlの細胞溶解液[4Mグアニジンチオシアン酸、25mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.5%N-ラウロイルサルコシナトリウム、0.1M2-メルカプトエタノール]を加えて溶解させ、続いて50μlの2M酢酸ナトリウム-酢酸(pH4.0)、さらに500μlの水飽和フェノールを加え、激しく混合した。これに、40μlの0.5g/ml磁性シリカ粒子(粒径1～10μm、四三酸化鉄粒子30%含有、比表面積280m<sup>2</sup>/g、細孔容積0.025ml/g、表面細孔直径2～6nm:鈴木油脂社製)の懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンド(MPC-M:ダイナル社製)に設置して磁性シリカ粒子を

集め、上清を除去した。さらに、マイクロチューブを磁気スタンドから外し、1mlの洗浄液[5.3Mグアニジンチオシアン酸、52mMトリス-塩酸(pH6.4)]を加えて十分に混合した後、同様に磁気スタンドに設置して上清を除去することにより、粒子を洗浄した。同様に、1mlの洗浄液にて再度、粒子を洗浄し、続いて1mlの70%エタノールで2回、100%エタノールで1回粒子を洗浄した。上清を除去した後、マイクロチューブを55℃に設定したヒートブロック上に設置し、20分間放置することによりチューブ内のエタノールを蒸発除去し、粒子を乾燥させた。これに100μlの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ80μlであった。

【0026】回収液のうち、10μlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン1)に示す。図1(レーン1)から明らかなように、本発明の方法により抽出されたRNAサンプル中にはゲノムDNAの混入はほとんど認められず、本発明の方法によってRNAを純度よく抽出精製できることが確認できた。

【0027】(3) RT-PCRによるヒトトランスフェリンレセプターRNAの検出

上記(2)にて得られた回収液に対して、ヒトトランスフェリンレセプターRNAをターゲットにRT-PCRをおこなうことにより、回収液中のRNAの検出を試みた。RT-PCRは、市販の試薬キットRT-PCR high(東洋紡績社製)とヒトトランスフェリンレセプター増幅用プライマー(Cl5407-1: Clontech社製)を使用して行った。まず、上記(2)にて得られた回収液のうち、10μlにM-MLV逆転写酵素、逆転写用プライマーを含む逆転写用試薬を加え、最終液量を20μlとし、これを42℃、20分間保温して逆転写反応をおこなった。また、並行して逆転写酵素を加えずに同様な操作をおこない、これを逆転写反応のネガティブコントロールとした。次に、逆転写後の反応液に耐熱性DNAポリメラーゼを含むPCR用試薬を加え、最終液量を100μlとし、DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus社製)にて95℃、1分間、56℃、1分間、72℃、1分間を30サイクル実施し、PCRをおこなった。反応液のうち、10μlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図2に示す。図中、レーン1はランダムファージDNAのPstI消化物からなるサイズマーカー、レーン2は実施例1に示す方法により抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物の泳動パターン、レーン3は逆転写反応のネガティブコントロールを使用したときのPCR増幅産物の泳動パターンを示す。図2から明らかなように、逆転写反応をおこなった反応液(レーン2)のみに増幅産物が見られ、本発明の方法によりRNAの抽出が可能

で、直ちにRT-PCRによる解析に使用できることが確認できた。

【0028】実施例2 C型肝炎ウイルス(HCV) RNAの抽出精製

(1)  $1 \times 10^7$  コピー/mlのHCVが含まれている血清を陰性血清により希釈して  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^3$  コピー/mlの希釈系列をつくり、これらを抽出材料とした。各希釈系列の血清サンプル50μl( $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^2$  コピー相当)を使用して、実施例1と同様な方法によりRNAの抽出をおこなった。

【0029】(2) RT-PCRによるHCV・RNAの検出

上記(1)にて得られた回収液に対して、HCV・RNAの非翻訳領域をターゲットにRT-PCRをおこなうことにより、回収液中のHCV・RNAの検出を試みた。RT-PCRは、市販の試薬キットRT-PCR high(東洋紡績社製)を使用しておこなった。まず、(1)にて得られた回収液のうち5μlにM-MLV逆転写酵素、逆転写用プライマーを含む逆転写用試薬を加え、最終液量を20μlとし、これを42℃、60分間保温して逆転写反応をおこなった。次に、逆転写後の反応液に耐熱性DNAポリメラーゼを含むPCR用試薬を加え、最終液量を25μlとし、DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus社製)にて、まず、94℃、30秒間、53℃、30秒間、72℃、1分間を38サイクル、さらにPCR用試薬を加え、最終液量を30μlとし、94℃、30秒間、50℃、1分間、72℃、1分間を28サイクル実施することにより、二段階のPCRをおこなった。反応液のうち、10μlをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図3に示す。図中、レーン1は、ラムダファージDNAのPstI消化物からなるサイズマーカー、レーン2～7は実施例2に示す方法により抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物の泳動パターンであり、レーン2及びレーン3は  $1 \times 10^4$  コピー、レーン4及びレーン5は  $1 \times 10^3$  コピー、レーン6及びレーン7は  $1 \times 10^2$  コピー相当のHCVを含む血清サンプルを使用したときの結果を示す。図3から明らかなように、  $1 \times 10^4$  コピーおよび  $1 \times 10^3$  コピー相当のHCVを含む血清サンプルについて増幅産物が見られ、本発明の方法により血清サンプルからのHCV・RNAの抽出が可能で、直ちにRT-PCRによる解析に使用できることが確認できた。

【0030】比較例1

従来法と比較して純度よくRNAを抽出精製できることを確認するため、カオトロピック物質とシリカ粒子を利用した従来法によりRNAの抽出を試みた。

実施例1(1)にて調製した細胞に、900μlの細胞溶解液[4.7Mグアニジンチオシアン酸、46mMトリス塩酸(pH6.4)、1.2%ポリオキシエチレンオクシルフェニル

エーテル、20mM EDTA)を加えて溶解させ、続いて40 $\mu$ lの0.5mg/ml磁性シリカ懸濁液を添加し、室温で10分間混合した。次に、マイクロチューブを磁気スタンドに設置して磁性シリカを集め、上清を除去した。次いで、実施例(2)の方法と同様にして、1mlの洗浄液[5.3Mグアニジンチオシアン酸、52mMトリス塩酸(pH6.4)]で2回、1mlの70%エタノールで2回、100%エタノールで1回粒子を洗浄した。上清を除去した後、マイクロチューブを55℃に設定したヒートブロック上に設置し、20分間放置することによりチューブ内のエタノールを蒸発除去し、粒子を乾燥させた。これに100 $\mu$ lの滅菌水を添加し、室温で10分間混合した後、磁気スタンドに設置して磁性シリカ粒子を集め、上清を回収した。回収液量はおよそ80 $\mu$ lであった。回収液のうちの10 $\mu$ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後、写真撮影した結果を図1(レーン2)に示す。図1(レーン2)から明らかなように、比較例1に示した従来法より抽出されたサンプル中には、

ゲノムDNAが多量に混入することが確認された。

#### 【0031】

【発明の効果】本発明によれば、適当な溶解液と核酸結合性固相を酸性条件下に使用することにより、生物材料に含まれるRNAを特異的に吸着させ、さらに適当な溶出液を使用することにより、煩雑な後処理操作を必要とすることなく該RNAを簡便に回収し、抽出精製できる。

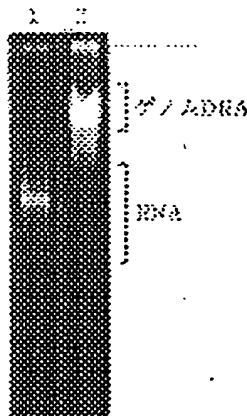
#### 【図面の簡単な説明】

10 【図1】本発明の方法と従来法により、培養細胞から抽出精製されたRNAのアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

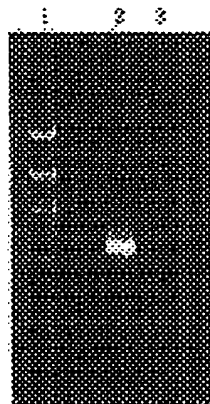
【図2】本発明の方法により、培養細胞から抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

【図3】本発明の方法により、HCV陽性血清から抽出精製されたRNAのRT-PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動パターンを示す図面に代える写真である。

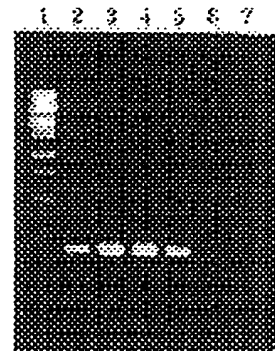
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内